

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2002-0063832

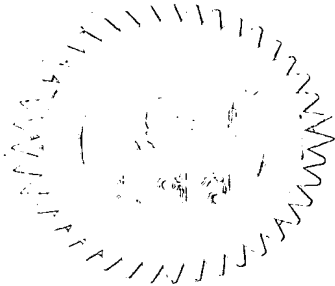
Application Number

출원년월일 : 2002년 10월 18일

Date of Application OCT 18, 2002

출원인 : (주)진매트릭스

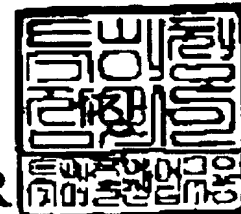
Applicant(s) GENEMATRIX INC.



2006년 03월 09일

특허청

COMMISSIONER



◆ This certificate was issued by Korean Intellectual Property Office. Please confirm any forgery or alteration of the contents by an issue number or a barcode of the document below through the KIPOnet- Online Issue of the Certificates' menu of Korean Intellectual Property Office homepage (www.kipo.go.kr). But please notice that the confirmation by the issue number is available only for 90 days.

**【서지사항】**

**【서류명】** 특허출원서  
**【권리구분】** 특허  
**【수신처】** 특허청장  
**【제출일자】** 2002. 10. 18  
**【발명의 국문명칭】** 염기변이 분석방법  
**【발명의 영문명칭】** Method for detecting base mutation

**【출원인】**

**【명칭】** (주)진매트릭스  
**【출원인코드】** 1-2001-003815-8

**【대리인】**

**【성명】** 이후동  
**【대리인코드】** 9-1998-000649-0  
**【포괄위임등록번호】** 2002-072597-2

**【대리인】**

**【성명】** 구현서  
**【대리인코드】** 9-2000-000082-0  
**【포괄위임등록번호】** 2002-072598-0

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 유왕돈  
**【성명의 영문표기】** Y00,Wang Don  
**【주민등록번호】** 580126-1005710  
**【우편번호】** 411-707  
**【주소】** 경기도 고양시 일산구 대화동 2234 장성마을 303-804  
**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 김수옥  
**【성명의 영문표기】** KIM,Soo Ok

**【주민등록번호】** 600501-2036228  
**【우편번호】** 138-747  
**【주소】** 서울특별시 송파구 가락2동 쌍용아파트 302동 503호  
**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 홍선표  
**【성명의 영문표기】** HONG,Sun Pyo

**【주민등록번호】** 680825-1026210

**【우편번호】** 135-230

**【주소】** 서울특별시 강남구 일원동 푸른마을 상호아파트 108동 150  
 4호

**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 김석준

**【성명의 영문표기】** KIM,Suk Joon

**【주민등록번호】** 670801-1056122

**【우편번호】** 150-102

**【주소】** 서울특별시 영등포구 양평동2가 23 벽산아파트 103동 1101  
 호

**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 지미선

**【성명의 영문표기】** JEE,Mi Sun

**【주민등록번호】** 770406-2030510

**【우편번호】** 142-868

**【주소】** 서울특별시 강북구 번동 466-28 4층

**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 김은옥  
**【성명의 영문표기】** KIM, Eun Ok  
**【주민등록번호】** 790224-2822431  
**【우편번호】** 158-076  
**【주소】** 서울특별시 양천구 신정6동 목동아파트 1434-503  
**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 문명순  
**【성명의 영문표기】** MOON, Myung Soon  
**【주민등록번호】** 801024-2026316  
**【우편번호】** 142-882  
**【주소】** 서울특별시 강북구 수유6동 551-24  
**【국적】** KR

**【심사청구】** 청구

**【핵산염기 및 아미노산 서열목록】**

**【서열개수】** 10  
**【서열목록의 전자문서】** 첨부

**【취지】** 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다.

대리인

이후동 (인)

대리인

구현서 (인)

**【수수료】**

<b>【기본출원료】</b>	20	면	29,000	원
<b>【가산출원료】</b>	10	면	10,000	원
<b>【우선권주장료】</b>	0	건	0	원
<b>【심사청구료】</b>	9	항	397,000	원

【합계】	436,000 원
【감면사유】	소기업(70%감면)
【감면후 수수료】	130,800 원
【첨부서류】	1. 요약서 · 명세서(도면)_1통

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 생명체의 유전자 염기변이를 정확하고 효율적으로 조사하는 방법에 관한 것이다.

**【대표도】**

도 1

## 【명세서】

### 【발명의 명칭】

염기변이 분석방법{Method for detecting base mutation}

### 【도면의 간단한 설명】

- <1>           도 1은 인간의 maspin 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 염기가 정상인 경우(C/C)의 7mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림.
- <2>           도 2는 인간의 maspin 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 염기가 정상인 경우(C/C)의 13mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림.
- <3>           도 3은 인간의 maspin 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 염기가 헤테로인 경우(C/T)의 7mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림.
- <4>           도 4는 인간의 maspin 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 염기가 헤테로인 경우(C/T)의 13mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림.
- <5>           도 5는 인간의 maspin 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 염기가 모두 T로 변이된 경우(T/T)의 7mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림.
- <6>           도 6은 인간의 maspin 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 염기가 모두 T로 변이된 경우(T/T)의 13mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림.
- <7>           도 7은 인간의 maspin(serpinb5) 유전자의 4번째 인트론의 3597번째 염기 가 정상인 경우(C/C)의 7 mer와 13 mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림.
- <8>           도 8은 인간의 maspin(serpinb5) 유전자의 4번째 인트론의 3597번째 염기 가

헤테로인 경우(C/T)의 7 mer와 13 mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림

<9> 도 9는 인간의 maspin(serpinb5) 유전자의 4번째 인트론의 3597번째 염기 가 모두 T로 변이된 경우(T/T))의 7 mer와 13 mer의 말디-토프 매스 스펙트로메트리 그림.

### 【발명의 상세한 설명】

### 【발명의 목적】

### 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<10> 생명체의 유전자분석은 질병에 대한 위험도, 진단, 예진 또는 치료방법의 제 시 등과 관련하여 광범위하게 사용되고 있다. 예를 들어, 특정인의 특정유전자에 대한 변이분석을 통하여 그 질병에 대한 위험도가 어느 정도인지 예측하여 예방노 력을 하도록 유도할 수 있다. 본 발명은 생명체의 유전자를 분석하는 방법에 관한 것으로서, 특별히 유전변이를 조사하는 방법에 관한 것이다.

<11> 인간의 지놈지도가 완성되어 가면서 질병에 대한 위험도의 측정, 질병의 진 단 또는 예진, 그리고 약물에 대한 반응의 예측을 보다 광범위하게 할 수 있다는 가능성이 제시되고 있다. 다수의 개체를 대상으로 지놈단위의 염기서열분석을 하면 개체간 다양성을 보이는 염색체상의 위치들이 나타나는데 이를 SNP(single nucleotide polymorphism)라고 한다. SNP는 생명체의 염색체에 배열되어 있는 염기 서열 중 일정 빈도 이상으로 나타나는 변이로서, 인간의 경우 약 1,000개 염기마다 1개 정도의 확률로 나타난다고 한다. 인간의 염색체 크기를 고려할 때, 수백만의



SNP가 존재하는 것이다. SNP는 개체간의 형질차이를 설명하는 수단으로 여겨지고 있어 질병의 원인을 규명하여 병을 예방하거나 치료하는데 사용될 수 있다.

<12>

인간 지놈프로젝트에 의해 발견된 SNP들은 개체간 다양성을 보인다는 사실만을 보여줄 뿐 그 다양성이 질병과 어떤 관련성이 있는지를 알려주지는 않는다. SNP와 질병과의 관계를 밝히기 위해서는 정상인과 환자에게서 나타나는 SNP의 변이 형태를 비교 분석(SNP스코링)하는 과정이 필요하다. SNP와 질병과의 관계를 명확하게 규명하기 위해서는 많은 수의 SNP를 분석하여야 할 뿐만 아니라, 변이를 오류없이 분석할 수 있어야 한다.

<13>

SNP스코링 방법으로는 DNA시퀀싱, PCR-SSCP(Polymerase chain reaction-Single stranded conformation polymorphism), 알렐특이적혼성화 (allele specific hybridization), 올리고리게이션 (oligo-ligation)법, 미니시퀀싱(mini-sequencing) 그리고 효소절단법에 의한 것들이 있다. DNA칩을 이용한 방법도 소개되고 있는데 원리적으로 알렐특이적혼성화와 다르지 않고, 다만 올리고뉴클레오타이드 프로브 등을 부착하는 고정상에 차별을 둔 것이다.

<14>

DNA시퀀싱은 맥삼-길버트법과 생거법이 있으나 현재는 후자의 방법이 주로 사용되고 있다. 이 방법은 특정위치의 유전변이 여부만을 조사하기 위한 방법이라기보다는 유전자 전체 또는 일부 부위의 염기서열을 밝히기 위한 방법이지만, 염기서열을 밝히면 특정 위치의 유전변이 여부도 확인할 수 있으므로 SNP스코링에 사용될 수 있다. 그러나, 조사하고자 하는 SNP의 변이만을 확인하는 것이 아니라 굳이 조사하지 않아도 되는 주변의 염기서열을 함께 읽는다는 면에서 비효율적이다.

- <15> PCR-SSCP(Orita, M. et.al, Genomics, 1989, 5:8874-8879)는 PCR로 분석하고자 하는 SNP를 포함하는 서열을 증폭한 후, 각각의 체인으로 분리시킨 다음, 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동을 수행한다. 1염기의 차이에 의하여 DNA 체인의 2차 구조가 달라지므로 이 차이에 기인한 전기영동 이동속도 차이에 따라 염기변이 여부를 조사한다.
- <16> 알렐특이적혼성화는 나일론 필터 등에 부착된 프로브에 방사선동위원소 등으로 표지된 샘플DNA를 혼성화하되, 온도 등 혼성화의 조건을 조절함으로써 염기변이의 여부를 조사하는 방법이다.
- <17> 올리고리게이션법(Nucleic Acid Research 24, 3728, 1996)은 주형DNA와 상보적이지 않은 상태에서는 리게이션(ligation)이 일어나지 않는 조건에서 반응을 수행하고 리게이션이 진행되었는지를 확인함으로써 염기변이를 조사하는 방법이다.
- <18> 미니시퀀싱(Genome Research 7:606, 1997)은 변이 여부를 조사하고자 하는 위치의 1개의 염기만이 중합되도록 조건을 맞추고 중합된 1개의 염기가 무엇인가에 따라 검출반응이 다르도록 고안된 방법으로 SNP스코어링을 위해서 개발된 방법이다.
- <19> PCR-SSCP, 알렐특이적혼성화, 올리고리게이션법 등은 폴리아크릴아마이드 겔을 사용하여 많은 양의 샘플을 분석하기에 불편하거나, 프로브가 원하는 위치에 결합하지 못해서 발생하는 오류를 확인하지 못한다는 문제점이 있다.
- <20> 미니시퀀싱은 SNP스코어링을 위해 개발된 기술이어서 분석이 간편하고 많은 양의 샘플 분석에 유리하지만, 오류에 의한 잘못된 결과를 확인하지 못하는 단점을

여전히 가지고 있고 염기의 결실(deletion)과 삽입(insertion)을 알아낼 수 없다는 한계가 있다.

<21>

SNP스코어링을 위해 개발된 기술 중 또 하나의 방법으로 효소절단법이 있다 (WO 01/90419). 이 방법은 분석하고자 하는 염기서열을 PCR과 같은 방법으로 증폭을 하되, 증폭된 결과물이 두 개의 제한효소에 의해 절단되거나 인지될 수 있는 염기서열을 포함하도록 한다. 증폭된 결과물을 두 가지의 제한효소로 절단하여 생성된 단편의 분자량을 측정하여 염기변이의 여부를 측정하는 방법이다. 이 분석방법은 PCR에 의한 유전자의 증폭 후 즉시 제한효소반응으로 단편을 만들어 mass spectrometry 등으로 분자량을 측정하므로 분석단계가 간편하고 빠른 장점을 가지고 있다. 그러나, WO 01/90419에 기재된 효소절단법은 여전히 오류에 의한 잘못된 분석을 확인하지 못한다. 예를 들어, PCR 수행시 프라이머가 원하지 않은 위치에 결합할 경우 잘못된 분석결과를 초래할 수 있는데, 원하지 않은 위치에 결합하였는지 확인할 수 없다는 문제가 있다. 즉 CYP2C9의 염기변이를 조사하기 위하여 사용한 프라이머가 CYP2C8에 결합하게 될 수 있는데, 이 경우 프라이머가 CYP2C9이 아닌 CYP2C8에 결합하였다는 사실을 확인할 수 없어 오류가 발생하였는지 여부를 확인하기 어렵다. 또한, 1염기가 다른 염기로 치환되는 변이는 검측이 가능하나, 염기의 결실(deletion) 또는 삽입(insertion)에 의한 변이는 검측하지 못한다는 문제점이 있다.

### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<22> 본 발명에서는 생명체의 유전변이를 정확하게 그리고 효율적으로 조사할 수 있는 방법을 개발하였다. 즉, 많은 시료의 SNP스코어링을 간편하고 빠르게 수행하면서도 프라이머가 잘못된 위치에 결합하여 생성될 수 있는 오류를 검증할 수 있도록 함으로써 정확한 염기변이 조사를 가능하도록 할 뿐만 아니라 결실 또는 삽입에 의한 유전변이도 검출할 수 있는 방법을 개발하였다.

### 【발명의 구성】

<23> 본 발명은 생명체의 유전변이를 정확하고 효율적으로 분석하는 방법을 제공한다.

<24> 본 발명은 유전변이를 분석하기 위하여 그 결과물이 제한효소로 절단될 수 있는 부위를 포함하도록 원하는 염기서열을 증폭하되 제한효소에 의해 절단된 단편의 염기의 수가 32개 이하가 되도록 하고 그 중 적어도 1개의 염기는 프라이머가 아닌 주형(template)의 복제에 의해 생성되도록 하고, 증폭된 생성물을 제한효소로 절단한 다음 분자량을 측정함으로써 유전변이를 분석하는 방법을 제공한다. .

<25> 본 발명은 유전변이를 분석하기 위하여 그 생성물이 제한효소로 절단될 수 있는 부위를 포함하도록 원하는 염기서열을 증폭하되 아래의 그림과 같은 구조의 단편을 만드는 방법을 제공한다.

<26>

5'-	프라이머	제한효소	프라이머	변이전	변이서열	변이후서열	프라이머	- 3'
	결합서열1	인지서열	결합서열2	서열			결합서열3	

&lt;27&gt;

'제한효소인지서열'은 서로 다른 제한효소에 의해 동시에 또는 인접하여 인지되는 서열로서 절단되는 서열과 일치하지 않을 수 있다. 예를 들어, FokI 과 BstF5I 은 모두 GGATG 서열을 인지하나 절단되는 위치는 인지서열의 3'말단으로부터 각각 9번째/13번째와 2번째/0번째 염기의 다음이다. 제한효소인지서열을 인지하는 본 발명에서 사용될 수 있는 두 제한효소는 서로 다른 최적온도를 가지고 있는 것이면 모두 사용이 가능하며, 상대적으로 낮은 최적온도를 갖는 제한효소로, FokI, Bbv I, Bsg I, Bcg I, Bpm I, BseR I, 또는 Bae I이 바람직하며, 상대적으로 높은 최적온도를 갖는 제한효소로 BstF5 I, Taq I, BsaB I, Btr I, BstAP I, Fau I, Bcl I, Pci I, 또는 Apo I이 바람직하고, FokI 및 BstF5 I쌍이 가장 바람직하다.

&lt;28&gt;

제한효소 Bae I는 25 °C, FokI, Bbv I, Bsg I, Bcg I, Bpm I 및 BseR I는 37 °C의 상대적으로 낮은 최적온도를 갖고, BstF5 I 및 Taq I는 65 °C, BsaB I, Btr I 및 BstAP I는 60 °C, Fau I는 55°C, Bcl I, Pci I 및 Apo I는 50 °C의 상대적으로 높은 최적온도를 갖는다.

&lt;29&gt;

PCR증폭에 사용하는 두 프라이머 중 하나는 프라이머결합서열1, 제한효소인지서열 그리고 프라이머결합서열2로 이루어져 있으며, 나머지 하나는 프라이머결합서열3로 이루어져 있다.

&lt;30&gt;

'프라이머결합서열'은 주형이 되는 핵산과 상보적으로 결합할 수 있는 서열이지만, 제한효소인지서열은 핵산과 상보적이지 않을 수 있다. 프라이머결합서열1, 2 그리고 3은 프라이머가 template DNA 와 결합하기 위해서는 적어도 4개 이상이어야 하므로 그 염기의 수가 4개 이상이어야 하며, 8-30개의 크기에서 template DNA 와 가장 잘 결합하였기 때문에 8개 이상 30개 이하인 것이 바람직하다. '변이전서열'은 조사하고자 하는 염기변이의 5'쪽의 서열이다. '변이서열'은 조사하고자 하는 염기의 변이에 해당하는 서열이다. 염기의 치환, 삽입, 결실이 일어날 수 있는데, 염기의 수는 1개인 것이 보통이나 2개 이상인 경우도 있다. '변이후서열'은 변이서열의 3'쪽의 서열이다.

&lt;31&gt;

변이전서열과 변이후서열을 합하여 1개 이상인 것이 바람직하다. 제한효소 절단 후 생성되는 절편은 변이서열을 포함하고 있어야 하고, 단편의 염기의 수는 2 ~ 32 개이어야 한다. 바람직하게는 12개의 염기를 가지는 것이 좋다. 절단된 절편의 크기를 수치한정한 이유는 MALDI-TOF을 분석할 때, 분석 결과가 양호한 절편의 사이즈를 반영한 것이다. 즉 한정된 범위 밖의 크기를 갖는 절편은 MALDI-TOF을 이용하여 분자량을 계산함으로써 염기변이를 조사함에 있어 적절하지 않은 크기이므로 상기와 같은 절편의 염기수가 바람직하다. 두 제한효소가 동일한 부위를 인지하므로 두 제한효소 중 어느 하나의 반응이 진행되는 동안에 다른 또 하나의 제한효소는 작용하지 않는 것이 바람직하다. 이러한 경우 증폭된 생성물을 제한효소로 절단할 때, 두 제한효소의 최적온도를 감안하여 서로 다른 온도에서 연이어 반응시킬 수 있다.

<32> 실시예1. 인간의 maspin 유전자의 4번째 인트론의 2741번째 염기의 염기변이  
 <33> 인간의 암전이 억제 유전자로 알려진 maspin (serpinb5) 유전자의 4번째 인  
 트론의 2741번째 염기 (rs1509477; 염색체 18번의 61001755번째 염기) 의 변이를  
 조사하였다.

<34> 1. PCR 증폭과 제한효소 절단

<35> Template DNA 의 서열(5'→3')은 아래와 같다.

<36> GTTTCACTTGATAAAGCAATAAAATGCTATTCAcAGCTGCATGAGGCTACACCCTTCTTTGAATGCAG

(서열정보1)

<37> 밑줄친 서열들은 아래의 프라이머 1과 2가 결합하는 부위들이다. 소문자로  
 표기된 염기는 '변이서열'이다.

<38> 프라이머 1. 5'- TCACTTGATAAAGCAATAAAAggatgGCTATTCA - 3' (34mer)(서열정  
 보2)

<39> 프라이머 2. 5'- CATTCAAAAGAAGGGTGTAGCCTCATGC - 3' (28mer)(서열정보3)

<40> 소문자로 표기된 서열은 FokI 및 BstF5I의 인지서열이다.

<41> PCR buffer(1x), MgSO<sub>4</sub> 2 mM, dNTP 200 mM, Platinum Taq

Polymerase(Invitrogen, 10966-026) 0.315U, 프라이머 1과 2 각각 0.5 uM, 지놈DNA  
 36 ng 을 넣고 총 반응부피를 18 ul로 맞춘다. 그리고 다음의 조건으로 PCR반응을  
 수행한다.

<42> 94℃ 2분,

<43> 94℃ 15초 55℃ 15초 72℃ 30초(10 cycles),

<44> 94℃ 15초 60℃ 15초 72℃ 30초(35 cycles)

<45> 지놈DNA는 혈액으로부터 추출하며 통상적인 방법에 따라 순수 분리한다. 예를 들어, 'SDS/단백질분해효소K'방법을 사용할 수 있다.(Maniatis,

<46> Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989) 또는 QIAamp DNA Mini Kit 250(Qiagen 51106)을 사용하여 혈액으로부터 DNA를 분리할 수 있다. DNA의 농도가 낮을 경우 다음과 같은 방법으로 DNA를 농축하여 사용할 수 있다. DNA 용액에 1/10 부피의 3M Sodium acetate (pH 5.3)과 2.5 부피의 에탄올을 넣고 부드럽게 섞은 다음 - 20℃에서 1시간 이상동안 방치한다. 4℃, 13000 rpm 에서 15분 동안 원심분리한다. 상층액을 조심스럽게 제거하고 70% 에탄올을 넣고 4℃, 13000 rpm 에서 10분 동안 원심분리한다. 에탄올을 건조시킨 다음 원하는 부피의 증류수를 넣어 녹인다.

<47> PCR 을 통해 생성되는 단편의 서열은 다음과 같다(5'→ 3').

<48> TCACTTGATAAAGCAATAAAAaggatgGCTATTCA[C/T]AGCTGCATGAGGCTACACCCCTTCTTTGAATG

(서열정보 4)

<49> AGTGAAC TATTT CGTTATTTTcctacCGATAAGT[G/A]TCGACGTACTCCGATGTGGGAAGAAAACCTTAC

(서열정보5)



<50> 소문자로 표기된 부위는 FokI 및 BstF5I에 의해 인지되는 서열이고 밑줄 친 부위는 제한효소의 절단에 의해 생성되는 절편의 서열이며, 대괄호로([]) 표기된 염기는 '변이서열'이다. 이 반응물에 FokI(NEB R109L) 1 U, BstF5I(NEB, V0031L) 1 U, 50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT(PH 7.9 @ 25℃) 반응 조성 하에서 25℃에서 2시간 연차적으로 45℃ 에서도 2시간 동안 반응을 실시한다.

<51> 효소반응의 최적화를 위하여, 증폭된 생성물을 FokI과 BstF5I으로 25℃, 37℃, 45℃, 55℃, 65℃ 에서 각각 반응한 결과 Fok I의 경우는 25℃ 에서 70%, 37℃에서 90%이상 반응이 진행되는 것으로 확인이 되었다. 아울러 BstF5I의 경우는 25℃ 제외한 온도에서 효소반응이 진행됨이 확인되었다. 따라서, FokI 만 작용할 수 있는 온도인 25℃에서 먼저 반응시키고 난 다음 BstF5I이 반응할 수 있는 온도인 37℃ 이상에서 반응시키는 것이 바람직하다.

## <52> 2. 정제 및 탈염

<53> 제한효소를 처리한 위의 용액으로부터 DNA절편을 순수분리한 다음 분자량을 측정하는 것이 바람직하다. 예를 들어, Nucleave Genotyping Kit

<54> (variagenics, USA) 를 사용할 수 있다. 먼저, 제한효소 반응액에 Conditioning reagent (1M TEAA) 70 μl를 넣어 1분간 둔다. Sample Preparation Plate에 conditioning reagent 70 μl와 위의 혼합액 90 μl를 차례로 넣어 column을 통과한 후에 Wash Reagent (0.1M TEAA) 85 μl를 5차례 완전히 통과시킨다. Sample Preparation Plate 를1000 rpm에서 5분간 원심분리한다. Collection Plate

위에 Sample Preparation Plate 을 위치시키고 Elution Reagent (60% isopropanol) 60  $\mu$ l 을 넣어 통과시킨다. 용출액이 Collection plate에 모아지면 Collection Plate를 115  $^{\circ}$ C 에서 75분간 건조시킨다.

### <55> 3.MALDI-TOF 매스 스펙트로메트리

<56> Collection plate 에 MALDI matrix(22.8 mg ammonium citrate, 148.5 mg hydroxypicolinic acid, 1.12 ml acetonitrile, 7.8 ml H<sub>2</sub>O) 6  $\mu$ l 를 넣은 후 그 중 4  $\mu$ l 를 MALDI-TOF(Biflex IV, Bruker) 의 Anchor chip plate 에 얹는다. 37  $^{\circ}$ C 에서 30분 동안 건조시키고 실온에 잠시 두어 열을 식힌 후 MALDI-TOF 으로 분석한다. 분석방법은 MALDI-TOF의 매뉴얼을 따른다.

<57> 4번째 인트론의 2741번째 염기가 정상인 경우(C/C), 효소절단 후 생성되는 절편의 분자량은 2135.4 D (7 mer)과 4078.6(13 mer) D 이다(도1 및 도2). 헤테로인 경우(C/T), 생성되는 절편의 분자량은 2135.4 D, 2150.4 D(이상 7 mer), 4078.6 D 그리고 4062.6 D (13 mer) 이다(도3 및 도4). 한편, 모두 T로 변이된 경우(T/T), 절편의 분자량은 2150.4 D(7 mer) 과 4062.6 D (13 mer) 이다(도5 및 도6).

<58> 실시예 2. 인간의 암전이 억제 유전자로 알려진 maspin (serpinb5) 유전자의 4번째 인트론의 3597번째 염기 (rs1396782; 염색체 18번의 61002611번째 염기)의 변이

<59> Template DNA 의 서열은 아래와 같다.

<60> CTGGAGTATTATCCTTGCAGGCTTGATATGAAGcTTGAAATTTCTCCCCAAAGAGATTTAGTTAACAGGCA

AA(서열정보 6)

<61> 위의 서열에서 밑줄친 부위는 아래의 프라이머3과 4가 각각 결합하는 부위이다. 소문자로 표기된 변이가 '변이서열'이다.

<62> 프라이머 3. 5' GAGTATTATCCTTGCAGGCTTggatgATATGAAG 3'(34 mer)(서열정보 7)

<63> 프라이머 4. 5' - GCCTGTAACTAAATCTCTTTGGGGAGAA 3'(29 mer)(서열정보 8)

<64> 위의 프라이머에서 소문자로 표기된 부위는 Template DNA 에 존재하지 않는 서열로서 FokI 및 BstF5I 에 의해 인지되는 서열이다. PCR 반응을 포함한 실험방법은 실시예1과 동일하다.

<65> PCR 을 통해 생성되는 단편의 서열은 다음과 같다.(5'→3')

<66> GAGTATTATCCTTGCAGGCTTggatgATATGAAG[C/T]TTGAAATTTCTCCCCAAAGAGATTTAGTTAAC

AGGC(서열정보 9)

&lt;67&gt;

CTCATAATAGGAACGTCCGAAcctacTATACTTC[G/A]AACTTTAAAGAGGGGTTTCTCTAAATCAATTG

TCCG(서열정보 10)

&lt;68&gt;

위의 서열에서 소문자로 표시된 부위는 제한효소인지서열이고 밑줄친 부위는 제한효소의 절단에 의해 생성되는 절편의 서열이며, 대괄호로([ ]) 표기된 염기는 '변이서열'이다. 이 반응물에 FokI(NEB R109L) 1 U, BstF5I(NEB, V0031L) 1 U, 50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT(PH 7.9 @ 25℃) 반응 조성 하에서 25℃에서 2시간 연차적으로 45℃ 에서도 2시간 동안 반응을 실시한다.

&lt;69&gt;

4번째 인트론의 3597번째 염기가 정상인 경우(C/C), 효소절단 후 생성되는 절편의 분자량은 2209.4 D (7 mer)과 3988.6(13 mer) D 이다(도 7). 헤테로인 경우(C/T), 생성되는 절편의 분자량은 2209.4 D, 2224.4 D(이상 7 mer), 3988.6 D 그리고 3972.6 D (13 mer) 이다(도 8). 한편, 모두 T로 변이된 경우(T/T), 절편의 분자량은 2224.4 D(7 mer) 과 3972.6 D (13 mer) 이다(도 9).

### 【발명의 효과】

&lt;70&gt;

본 발명은 기존의 염기변이 분석방법이 가지고 있었던 오류에 의한 잘못된 분석을 검증할 수 있었으며 삽입 및 결실의 검사 불가능의 문제를 해결하였다.

## 【특허청구범위】

### 【청구항 1】

- a) 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머를 이용하여 특정 폴리뉴클레오타이드를 증폭하는 단계;
- b) 상기 증폭된 특정 폴리뉴클레오타이드를 서로 다른 최적온도를 갖는 제한효소를 이용하여 절단하는 단계; 및
- c) 상기 절단된 절편의 분자량을 측정하는 단계를 포함하는 유전자 변이 분석방법.

### 【청구항 2】

- 제 1 항에 있어서,
- 상기의 포워드 프라이머는 프라이머 결합서열1, 제한효소인지서열, 및 프라이머결합서열2를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 변이 분석방법.

### 【청구항 3】

- 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,
- 상기의 포워드 프라이머는 서열정보2 또는 7에 기재된 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 유전자 변이 분석방법.

### 【청구항 4】

- 제 1 항에 있어서,
- 상기의 리버스 프라이머는 서열정보 3 또는 8의 염기서열을 갖는 것을 특징

으로 하는 유전자 변이 분석방법.

**【청구항 5】**

제 1 항에 있어서,

상기의 제한효소 처리단계는 하나의 반응이 진행되는 동안 다른 효소반응이 진행되지 않은 것을 특징으로 하는 유전자 변이 분석방법.

**【청구항 6】**

제 1 항 또는 제 5 항에 있어서,

상기의 제한효소는 FokI, Bbv I, Bsg I, Bcg I, Bpm I, BseR I, 및 Bae I으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 낮은 최적온도를 갖는 제한효소와 BstF5 I, Taq I, BsaB I, Btr I, BstAP I, Fau I, Bcl I, Pci I, 및 Apo I으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 높은 최적온도를 갖는 제한효소인 것을 특징으로 하는 유전자 변이 분석방법.

**【청구항 7】**

제 1 항에 있어서,

제한효소의 절단에 의해 생성된 절편은 변이서열을 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 유전자 변이 분석방법.

**【청구항 8】**

제 1 항 또는 제 7 항에 있어서,

제한효소의 절단에 의해 생성된 절편의 염기 수는 2-32인 것을 특징으로 하

는 유전자 변이 분석방법.

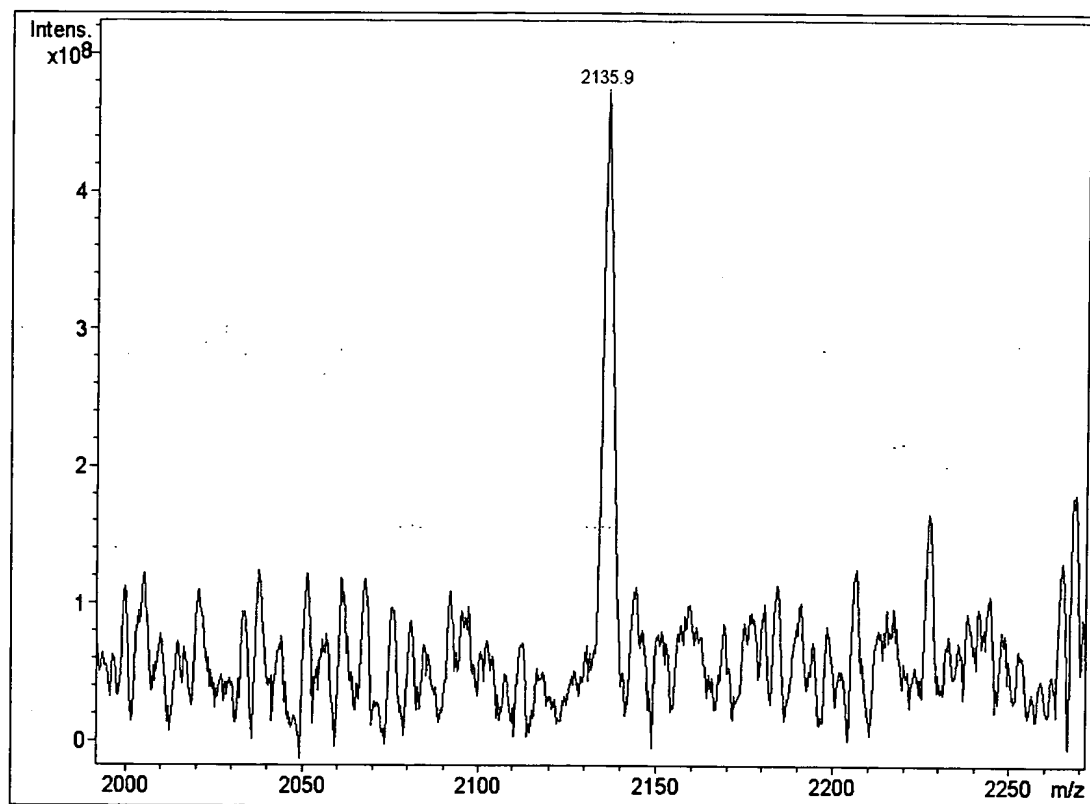
**【청구항 9】**

제 8 항에 있어서,

상기의 절편의 염기 수는 12개 인 것을 특징으로 하는 유전자 변이  
분석방법.

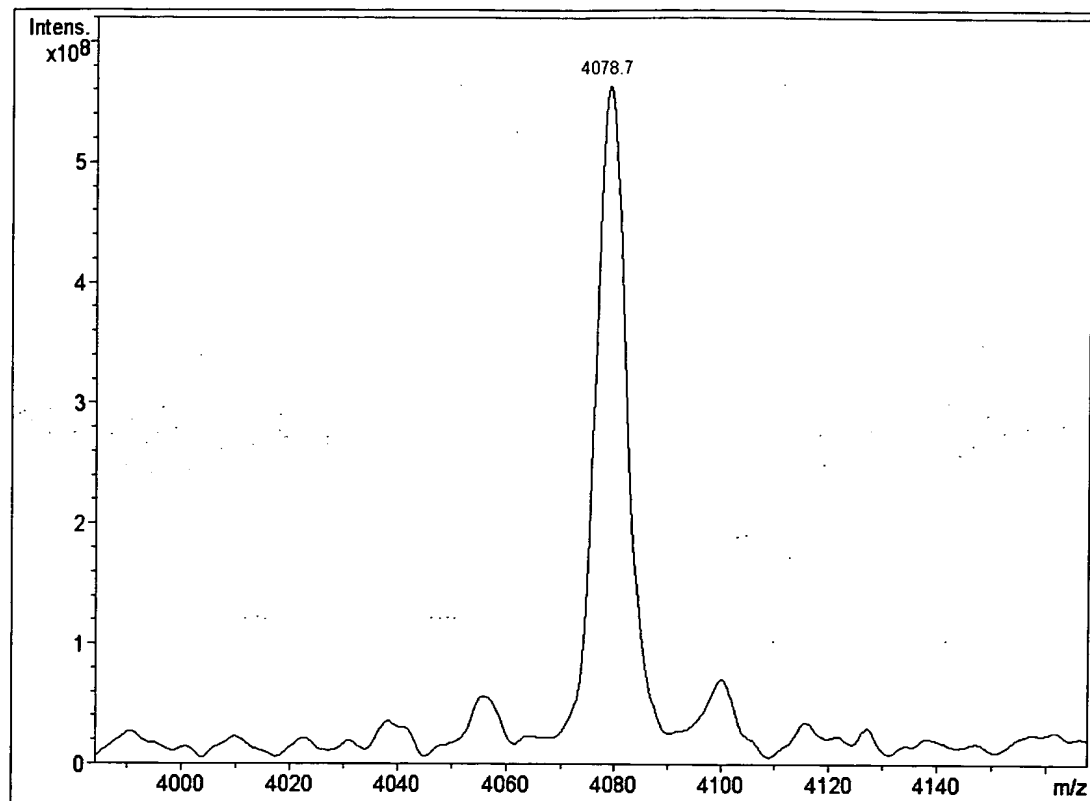
【도면】

【도 1】

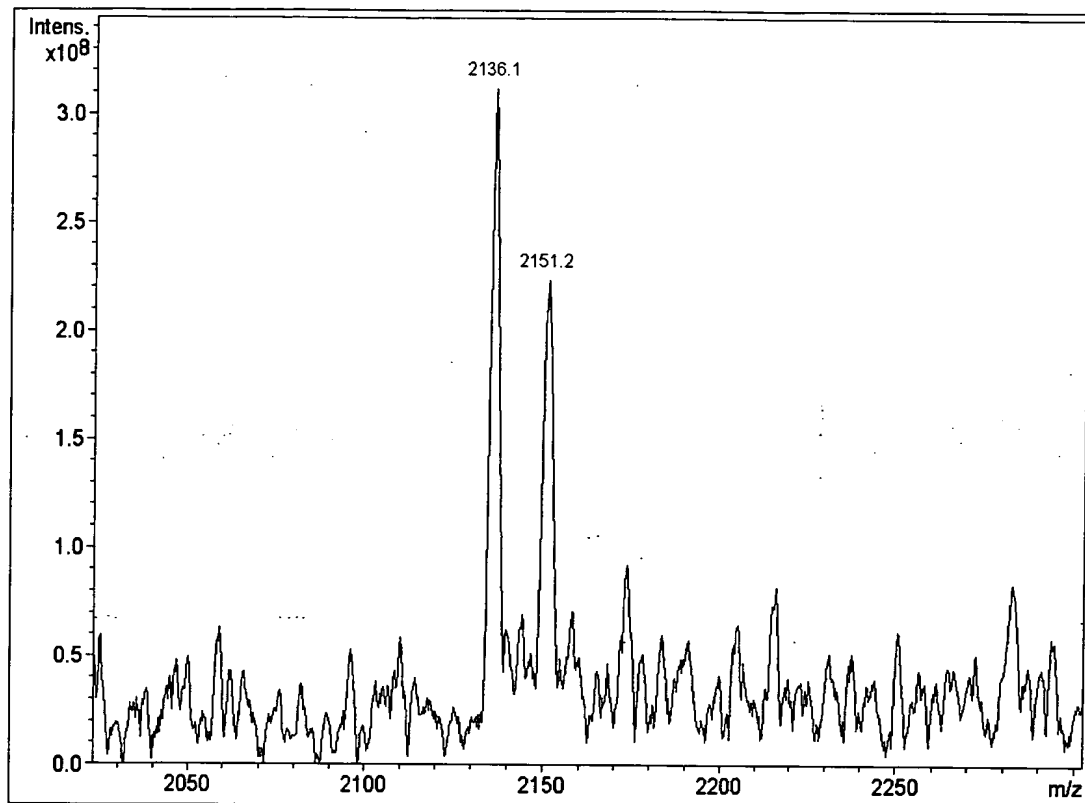




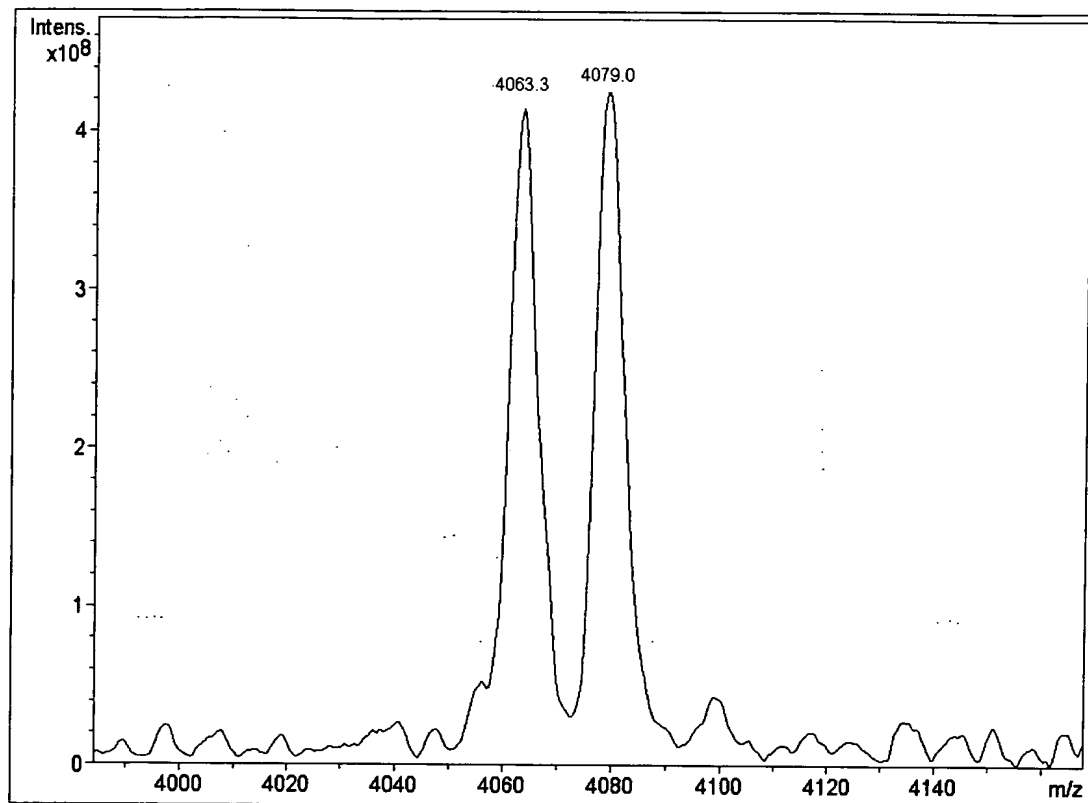
【도 2】



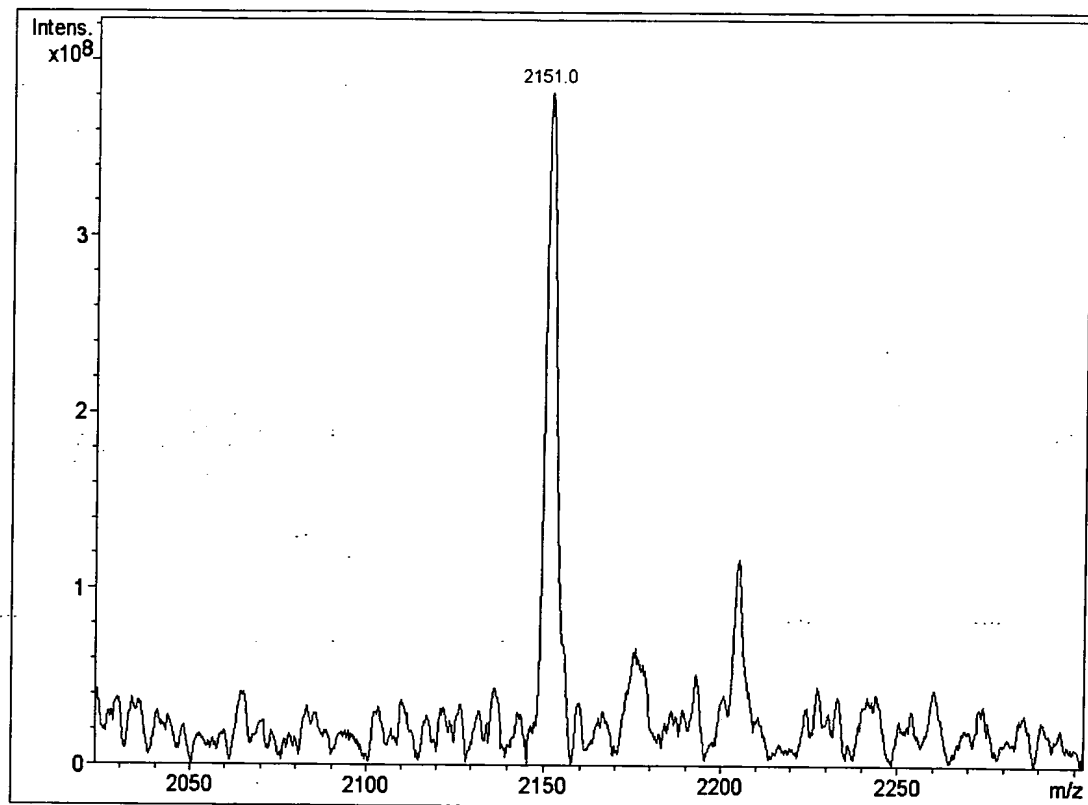
【도 3】



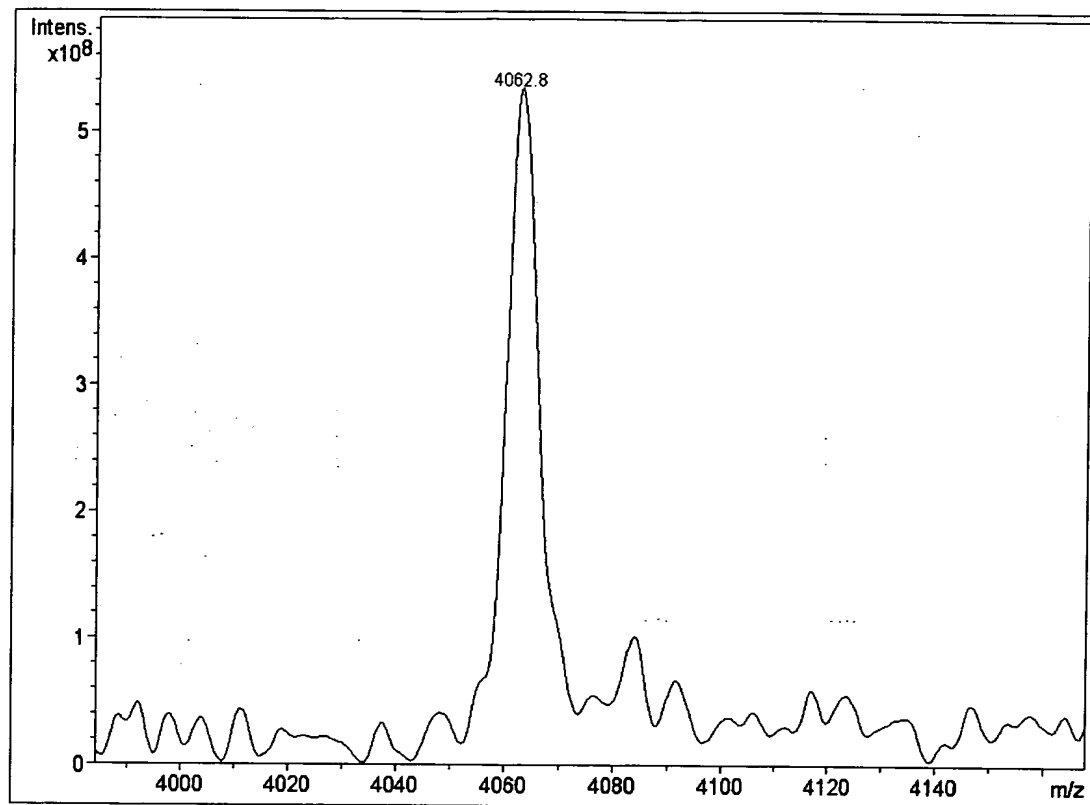
【도 4】



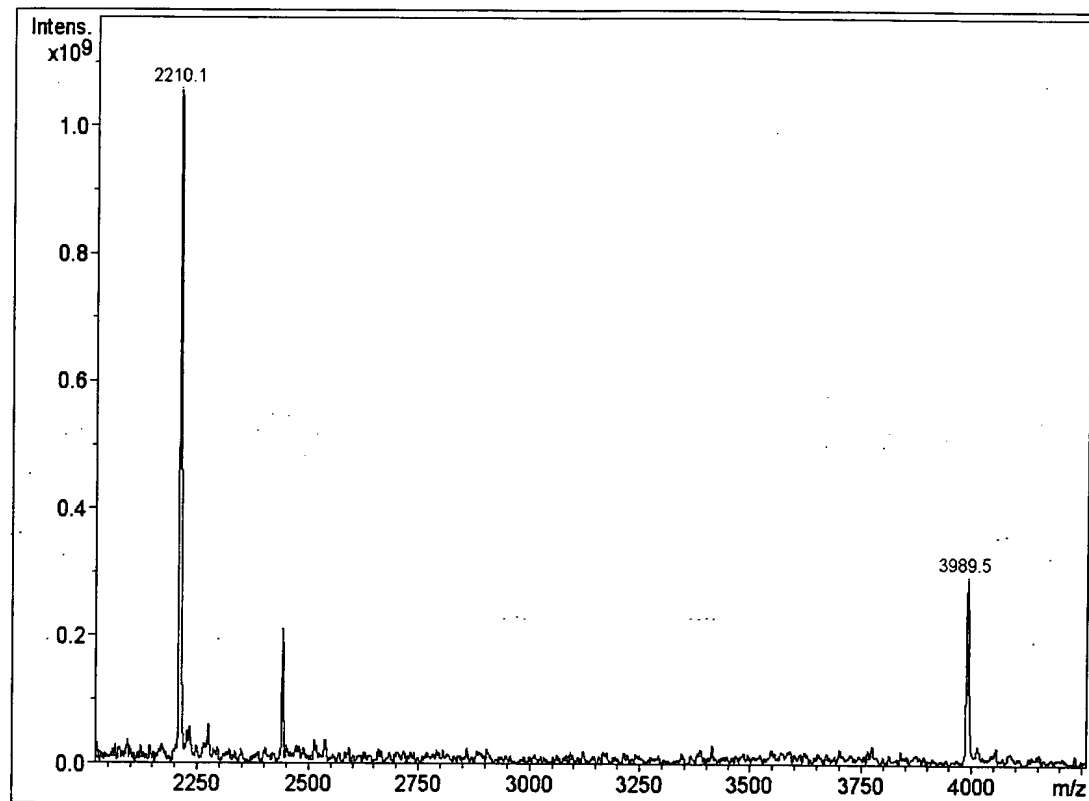
【도 5】



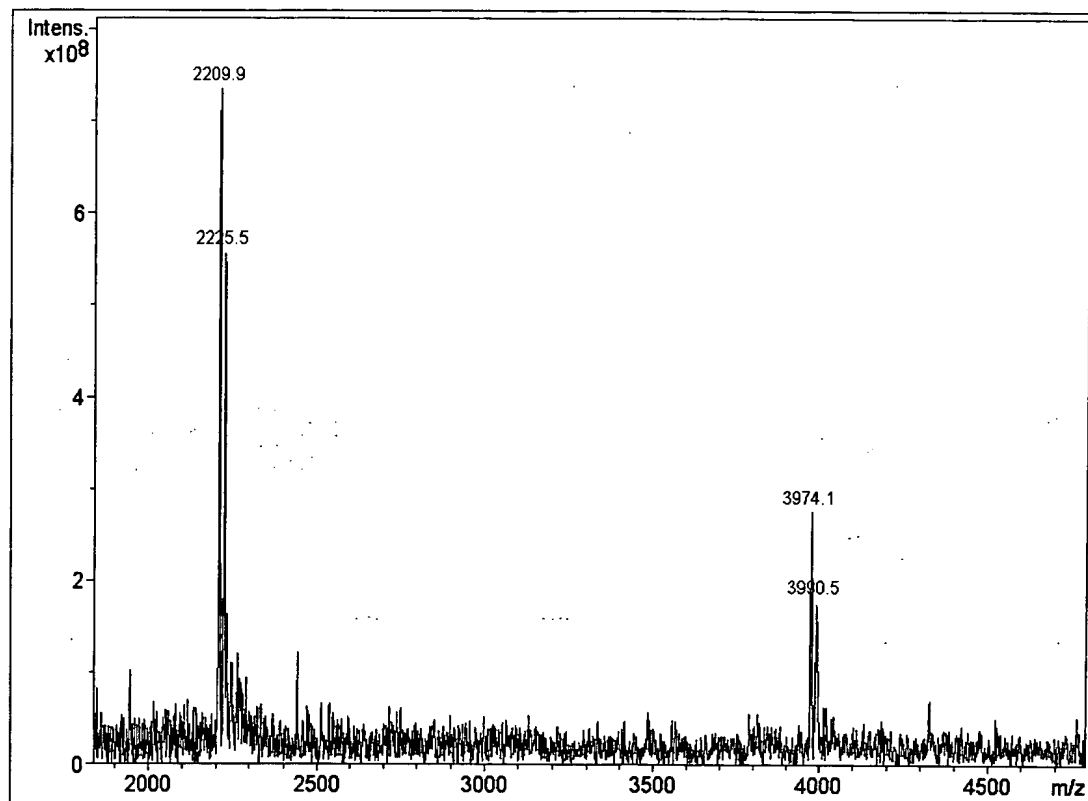
【도 6】



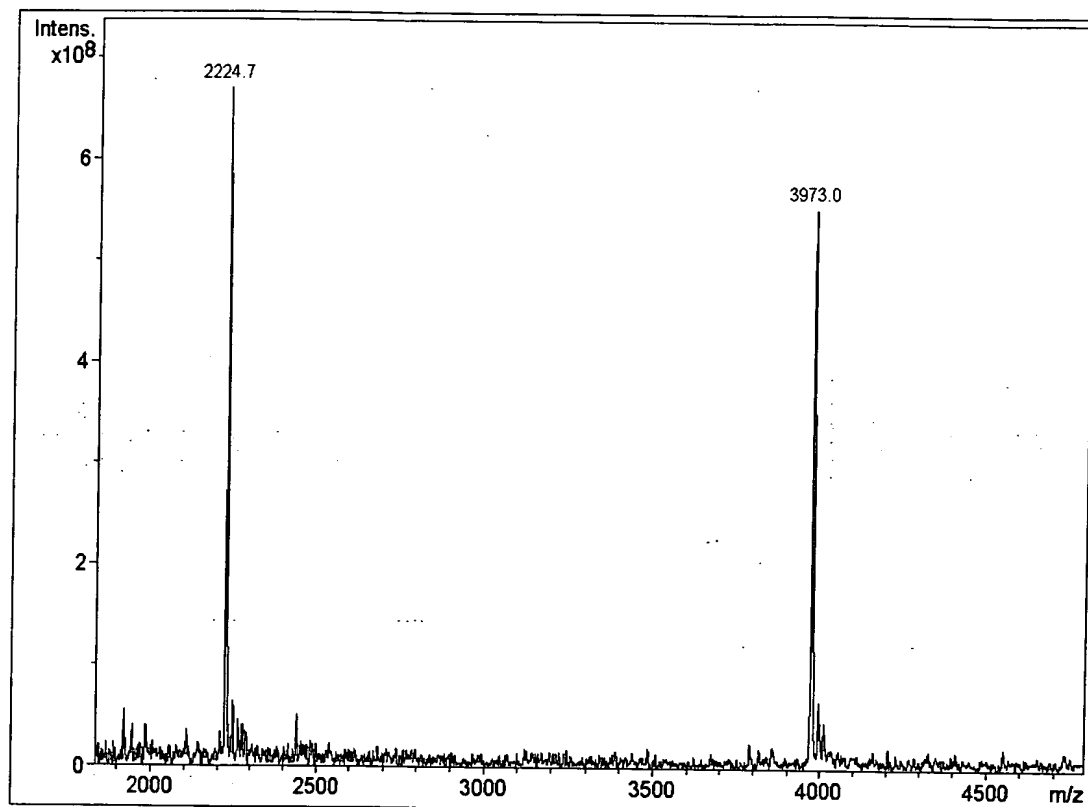
【図 7】



【도 8】



## 【도 9】



## 【서열목록】

<110> GeneMatrix Inc.;Yoo, Wang Don  
 <120> Method for detecting base mutation  
 <130> 02DPA119  
 <160> 10  
 <170> KopatentIn 1.71  
 <210> 1  
 <211> 69  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1



gtttcacttg ataaagcaat aaaatgctat tcacagctgc atgaggctac acccttcttt 60  
tgaatgcag 69  
<210> 2  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Forward primer for 4th intron region of maspin gene  
<400> 2  
tcacttgata aagcaataaa aggatggcta ttca 34  
<210> 3  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Reverse primer for 4th intron region of maspin gene  
<400> 3  
cattcaaaag aagggtgtag cctcatgc 28  
<210> 4  
<211> 68  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Resulting PCR Fragment  
<400> 4  
tcacttgata aagcaataaa aggatggcta ttcactagct gcatgaggct acacccttct 60  
tttgaatg 68  
<210> 5  
<211> 68  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Resulting PCR Fragment  
<400> 5  
agtgaactat ttcgttattt tctaccgat aagtgatcga cgtactccga tgtgggaaga 60  
aaacttac 68  
<210> 6  
<211> 73

<212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6  
 ctggagtatt atccttgacag gcttgatatg aagcttgaaa tttctcccca aagagattta 60  
 gttaacaggc aaa 73  
 <210> 7  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Forward primer for 4th intron region of maspin gene  
 <400> 7  
 gattattatc cttgcaggct tggatgatat gaag 34  
 <210> 8  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Reverse primer for 4th intron region of maspin gene  
 <400> 8  
 gcctgttaac taaatctctt tggggagaa 29  
 <210> 9  
 <211> 72  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Resulting PCR Fragment  
 <400> 9  
 gattattatc cttgcaggct tggatgatat gaagcttga aatttctccc caaagagatt 60  
 tagttaacag gc 72  
 <210> 10  
 <211> 72  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Resulting PCR Fragment  
 <400> 10

ctcataatag gaacgtccga acctactata cttcgaaact ttaaagagg gtttctctaa 60  
atcaattgtc cg 72